

Isolasi dan Identifikasi *Egg Drop Syndrome Virus* dengan Uji Hemagglutinasinasi dan Hemagglutinasinasi Inhibisi

Isolation and Identification of *Egg Drop Syndrome Virus* with Hemagglutination and Hemagglutination Tests

Fidyah Fitrawati¹, Michael Haryadi Wibowo¹, Surya Amanu¹, Bambang Sutrisno¹

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Email: fidyah.fitrawati@mail.ugm.ac.id

Abstract

Egg drop syndrome (EDS) is a disease that attacks layer hens in the production phase causing failure of peak eggs production, decreased in eggs production, and presence of eggs without shell. This study was conducted to isolate and identify the EDS virus in the chicken layer that was diagnosed as a disease of EDS by hemagglutination (HA) and hemagglutination inhibition (HI) assays. Specific pathogen free (SPF) layer chickens which were passing through the production phase fed with food which was mixed with egg without shell from SR/WNO/2011. The chicken together with chicken FF/Sleman/2011 were dissected when pathological lesions, such as the dents or palor eggs observed. The uterine tissues were then collected for samples. Infundibulum of chicken FF/Sleman/2011 was explored and was found out that the eggs were lack of egg shells. The eggs were then washed using sterile PBS. The three subsequent samples were propagated in the allantoic fluid of embryonated duck eggs for 16 days. Allantoic fluid was harvested after being incubated for 4 days. It was then tested by HA and HI assay by use of *avian influenza virus* (AIV), *Newcastle disease virus* (NDV), and EDS anti serum. The HA and HI test with EDS anti serum used chickens erythrocytes in percentage of 0,8. The HA test in uterine sample of both SR/WNO/2011 and FF/Sleman/2011 showed the titer 2³ HA units and egg washed water sample of FF/Sleman/2011 showed titer 2² HA units. The HI test for comparison with ND and AI anti serum was negative, while the test with EDS anti serum showed positive results. Based on the HA and HI test results, it was concluded that the virus grown in the allantoic fluid is EDS virus.

Key words: *Egg drop syndrome*, hemagglutination (HA), hemagglutination inhibition (HI), AIV, NDV

Abstrak

Egg drop syndrome (EDS) merupakan penyakit yang menyerang ayam layer fase produksi dan menyebabkan tidak tercapainya puncak produksi, penurunan produksi, serta adanya telur tanpa kerabang. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi virus EDS pada ayam layer yang didiagnosis sebagai penyakit EDS dengan uji hemaglutinasi (HA) dan hemaglutinasi inhibisi (HI). Ayam layer *Specific Pathogen Free* (SPF) yang sedang dalam masa produksi diberi campuran pakan telur tanpa kerabang dari SR/WNO/2011. Ayam tersebut bersama dengan ayam FF/Sleman/2011 dinekropsi ketika telah menunjukkan gejala infeksi dan diambil uterusnya untuk dijadikan sampel. Gejala infeksi ditunjukkan oleh adanya telur berbentuk tidak teratur dan atau pucat. Ayam FF/Sleman/2011 dieksplorasi pada bagian infundibulum dan ditemukan telur tanpa kerabang. Telur tersebut kemudian dicuci menggunakan PBS steril dengan antibiotik dan dijadikan sampel. Ketiga sampel selanjutnya dipropagasi di dalam cairan allantois telur bebek berembrio SPF yang berumur 16 hari. Cairan allantois dipanen setelah diinkubasi selama 4 hari, kemudian dilakukan uji HA dan HI dengan serum anti *avian influenza virus* (AIV), *Newcastle disease virus* (NDV), serta EDS. Uji HA dan HI dengan serum anti EDS menggunakan eritrosit ayam 0,8%. Uji HA sampel uterus SR/WNO/2011 dan FF/Sleman/2011 keduanya menunjukkan titer 2^3 unit HA dan sampel air cuci telur FF/Sleman/2011 2^2 unit HA. Uji HI sebagai pembanding dengan serum anti ND dan AI menunjukkan hasil negatif, sementara uji dengan serum anti EDS menunjukkan hasil positif. Berdasarkan hasil uji HA dan HI tersebut dapat disimpulkan virus yang tumbuh pada cairan allantois merupakan virus EDS.

Kata kunci : *egg drop syndrome* , hemaglutinasi (HA), hemaglutinasi inhibisi (HI), AIV, NDV

Pendahuluan

Egg drop syndrome - 1976 (EDS 76) merupakan penyakit infeksius pada ayam betina layer yang manifestasinya berupa penurunan produksi telur secara cepat, kegagalan mencapai puncak produksi, telur yang berbentuk tidak teratur, kerabang lembek atau tanpa kerabang, dan depigmentasi (Dinev, 2007). Penyakit tersebut ditimbulkan oleh virus dan telah menjadi penyebab utama penurunan produksi telur di seluruh dunia (Adair and Joan, 2008). Virus EDS sebagai salah satu *adenovirus* memiliki bentuk simetris ikosahedral, mengandung molekul linear tunggal dari *double stranded deoxyribonucleic acid* (ds DNA), tidak beramplop, dan bereplikasi di nukleus membentuk benda inklusi (Quinn *et al.*, 2007). Virus EDS secara ultrastruktur berukuran 76 nm hingga 80 ± 5 nm dan memiliki sisi segitiga dengan 6

kapsomer di tepi serta *fiber* 25 nm yang menonjol dari tiap penton. Estimasi berat molekular DNA-nya $22,6 \times 10^6$ d. Virus EDS memiliki 13 polipeptida struktural (Adair and Joan, 2008). Benda inklusi intranukleus yang dihasilkan merupakan salah satu struktur spesifik yang dapat dihasilkan virus EDS. Ukurannya jauh lebih besar dari partikel virus dan seringkali memiliki afinitas terhadap pengecatan asam (Brooks *et al.*, 2005).

Virus EDS tumbuh baik pada embrio bebek dan mampu mengaglutinasi eritrosit unggas, namun tidak mengaglutinasi eritrosit mamalia (Rasool *et al.*, 2005). Kemampuan hemaglutinasinya disebabkan oleh adanya *fiber*, yaitu suatu trimer polipeptida. *Fiber* tersebut akan membentuk ikatan dengan reseptor sel hospes dan bertindak sebagai hemagglutinin spesifik (Zuckerman *et al.*, 2009). *Fiber* tersebut memiliki panjang 25 nm dan diameter 2 nm (Kraft *et al.*, 1979).

Penyakit EDS umumnya menyerang ayam layer betina berumur lebih dari 36 minggu (Quinn *et al.*, 2007). Masa inkubasinya berlangsung singkat yaitu antara tiga sampai empat hari. Penyakit EDS pada ayam broiler ditemukan pada umur lima sampai enam minggu, tetapi bersifat subklinis (Kencana, 2012). Gejala awal infeksi virus EDS berupa hilangnya pigmentasi pada telur. Hal tersebut diikuti munculnya telur berkerabang tipis, lembek, atau bahkan tanpa kerabang. Kerabang yang tipis seringkali memiliki permukaan yang kasar dengan tekstur seperti pasir atau memiliki granula kasar di salah satu ujungnya (Adair and Joan, 2008). Telur yang dihasilkan menjadi mudah pecah akibat kualitas kerabang yang jelek. Ayam juga mengalami kegagalan mencapai target produksi dan tertundanya waktu berproduksi. Penurunan produksi telur mirip dengan gejala penyakit *infectious bronchitis* (IB), *Newcastle disease* (ND), dan *avian influenza* (AI), namun ketiga penyakit virus ini selalu menunjukkan gejala sakit sementara EDS bersifat subklinis (Kencana, 2012). Infeksi EDS alami dapat menyebabkan penurunan ukuran telur. Gejala lain yang dapat muncul adalah penurunan kekentalan albumin telur bagian luar, berbeda pada penyakit IB yang semua albuminnya (luar dan dalam) menjadi encer (Tabbu, 2000). Mortalitas hanya terjadi pada kasus-kasus tertentu dan kematian tersebut disebabkan oleh salphingitis dan peritonitis (Murtidjo, 1992).

Isolasi dan propagasi virus EDS dapat dilakukan dengan menggunakan telur berembrio (*in ovo*). Pemilihan rute inokulasi dan umur embrio yang akan digunakan ditentukan oleh selektivitas virus terhadap membran tertentu atau fase perkembangan embrio (Burleson *et al.*, 1992). Rute inokulasi yang dapat digunakan untuk isolasi virus

EDS adalah pada ruang allantois. Inkubasi telur sebelum inokulasi adalah 38 °C sampai 39 °C pada inkubator. Kelembaban harus dijaga pada 60 persen dan telur dibalik minimal sekali per hari. Viabilitas embrio dalam telur diperiksa sebelum diinokulasi dengan cara meneropongnya menggunakan cahaya di ruang gelap. Lima sampai enam hari setelah diinkubasi pembuluh darah dapat terlihat pada telur yang fertil sedangkan pada telur infertil tampak kosong dan transparan (Merchant and Packer, 1961). Inokulasi virus pada ruang allantois menghasilkan virus pada cairan allantois. Virus yang ada kemudian dapat dipanen dengan mengambil cairan allantois (Mahy and Hillar, 1996).

Identifikasi dapat dilakukan dengan berbagai uji, di antaranya uji hemaglutinasi dan hemaglutinasi inhibisi. Hemaglutinasi adalah terbentuknya agregat sel eritrosit oleh partikel hemaglutinin virus. Hal ini dapat terjadi karena ikatan antara protein luar virus hemagglutinin dengan reseptor permukaan eritrosit (Burleson *et al.*, 1992). Prinsip metodenya adalah mencampurkan satu sampai dua tetes virus dengan suspensi eritrosit. Hemaglutinasi biasanya akan tampak dalam waktu satu menit pada uji cepat (Merchant and Packer, 1961). Proses hemaglutinasi sendiri berlangsung apabila virus dapat mengikat dua eritrosit secara simultan sehingga terbentuk semacam jembatan silang (*cross bridge*). Hal ini mengharuskan jumlah virus dan eritrosit yang ekuivalen (Burleson *et al.*, 1992).

Penentuan kuantifikasi antibodi dan identifikasi virus dapat dilakukan dengan uji hemaglutinasi inhibisi (HI). Uji ini memiliki prinsip mengukur level antibodi dengan cara dilusi yang dapat mencegah hemaglutinasi eritrosit oleh virus (Mahy and Hillar, 1996). Komponen dasar uji HI

adalah antigen HA, serum yang didilusi dan konsentrasinya menurun, dan suspensi eritrosit. Hasil uji HI dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya konsentrasi antigen HA yang digunakan, konsentrasi suspensi eritrosit, waktu antara mencampur serum, antigen, penambahan eritrosit, serta suhu saat pencampuran (Purchase *et al.*, 2008). Faktor lain yang dapat berpengaruh adalah kontaminasi bahan kimia, enzim bakteri, dan toksin (Merchant and Packer, 1961).

Penyakit EDS di Indonesia ditemukan di berbagai daerah di Jawa, Sumatra, Kalimantan, Sulawesi, Bali, dan Nusa Tenggara (Tabbu, 2000). Penelitian mengenai EDS di Indonesia yang pernah dilakukan antara lain tentang berbagai aspek penyakit EDS (Nuriyanto, 1983) dan pengukuran titer antibodi ayam yang divaksin EDS (Isandiny, 2010). Adanya kasus terduga EDS di lapangan dan kebutuhan akan identifikasi penyebab penyakit menjadi alasan mengapa penelitian ini dilakukan.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan tiga sampel. Sampel pertama berupa uterus ayam layer *specific pathogen free* (SPF) yang diinfeksi telur tanpa kerabang dari sampel SR/WNO/2011. Sampel lainnya berupa uterus dan telur dalam infundibulum yang keduanya didapatkan dari ayam terduga EDS sampel FF/Sleman/2011.

Ayam layer SPF masa produksi diinfeksi dengan diberi campuran pakan telur tanpa kerabang yang diambil dari sampel EDS SR/WNO/2011. Pakan campuran diberikan *ad libitum* sebanyak empat kali dalam waktu 17 hari. Perubahan yang terjadi pada telur yang dihasilkan kemudian diamati. Ayam selanjutnya dinekropsi saat ayam telah

menunjukkan gejala infeksi dan uterusnya diambil. Ayam FF/Sleman/2011 yang diduga terinfeksi EDS dan menunjukkan gejala infeksi juga dinekropsi. Uterusnya diambil dan dijadikan sampel. Uterus-uterus tersebut direndam dalam larutan kloramfenikol 100 mg/ml. Uterus kemudian dibuat suspensi dengan cara menggerusnya di lumpang steril hingga hancur kemudian ditampung di konikel dan disentrifus 3600 rpm selama 10 menit, supernatan ditampung di tabung mikro Eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan antibiotik Kloramfenikol 100 mg/ml perbandingan 1:1 dan ketokenazol \pm 1:7. Suspensi didiamkan selama 2 sampai 3 jam agar antibiotik dan antifungal bekerja sebelum diinokulasikan (Rasool *et al.*, 2005; Purchase *et al.*, 2008).

Ayam FF/Sleman/2011 dinekropsi dan dieksplorasi pada bagian infundibulum. Telur yang ada di dalamnya dicuci menggunakan PBS steril. Air dari hasil cucian tersebut kemudian ditampung di konikel dan disentrifus 3600 rpm selama 10 menit. Supernatan ditampung di tabung mikro eppendorf 1,5 ml dan diperlakukan sama seperti sampel uterus, yaitu ditambahkan antibiotik dan antifungal kemudian didiamkan 2 sampai 3 jam sebelum diinokulasikan (Rasool *et al.*, 2005).

Telur yang digunakan untuk isolasi adalah telur bebek berembrio (TBB) berumur 17 hari. Menurut MacLachlan dan Edward (2011), virus EDS dapat tumbuh dengan titer tinggi pada media tersebut. Telur diteropong terlebih dahulu untuk menentukan batas rongga udara dan letak kepala. Telur kemudian didesinfeksi menggunakan iodine dan dilubangi dengan bor kecil. Suspensi sebanyak 0,3 ml diinokulasikan pada ruang chorioallantois. Lubang kemudian ditutup dengan parafin cair. Telur selanjutnya disimpan dalam mesin tetas. Setiap hari

telur diteropong untuk mengetahui kondisi embrio. Embrio diindikasikan mati pada hari ke empat. Telur dikeluarkan dari mesin tetas dan disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Cairan allantois dalam telur dipanen setelah 24 jam menggunakan spuit ukuran 5 ml (Burleson *et al.*, 1992; Mahy and Hillar, 1996).

Identifikasi dengan uji HA dan HI memerlukan suspensi eritrosit. Darah yang digunakan berasal dari ayam yang diketahui bebas virus EDS. Darah segar dicampur antikoagulan berupa citrat dengan perbandingan 5:1. Darah kemudian disentrifus 3600 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang dan ditambah PBS hingga mencapai volume seperti semula. Proses sentrifus dan penambahan PBS dilakukan sebanyak tiga kali. Langkah selanjutnya suspensi dimasukkan ke dalam tabung PCV atau hematokrit dan disentrifus 3600 rpm selama 10 menit. Hasil yang didapatkan tiap ml dihitung sebagai 10 PCV. Jumlah PCV kemudian dibagi angka konsentrasi eritrosit dan didapatkan hasil perbandingan suspensi dengan PBS. Menurut Adair dan Joan (2008), uji hemaglutinasi untuk virus EDS yang sesuai menggunakan eritrosit ayam 0,8%. Perbandingan untuk hasil 10 PCV dihitung $10/0,8 = 12,5$; sehingga eritrosit: PBS = 1: 12,5 (Burleson *et al.*, 1992).

Cairan allantois yang didapatkan dari hasil inokulasi diuji HA dan HI. Uji HA dilakukan dengan memberikan 0,05 ml PBS pada 12 sumuran yang ada di pelat mikro. Cairan allantois sebanyak 0,05 ml selanjutnya ditambahkan pada sumuran pertama, kemudian didilusi sampai sumuran ke sebelas. Eritrosit ayam (EA) 0,8% sebanyak 0,05 ml ditambahkan ke masing-masing sumuran. Pembacaan titer hemaglutinasi dimulai setelah eritrosit pada sumuran ke dua belas mengendap (Merchant and Packer, 1961).

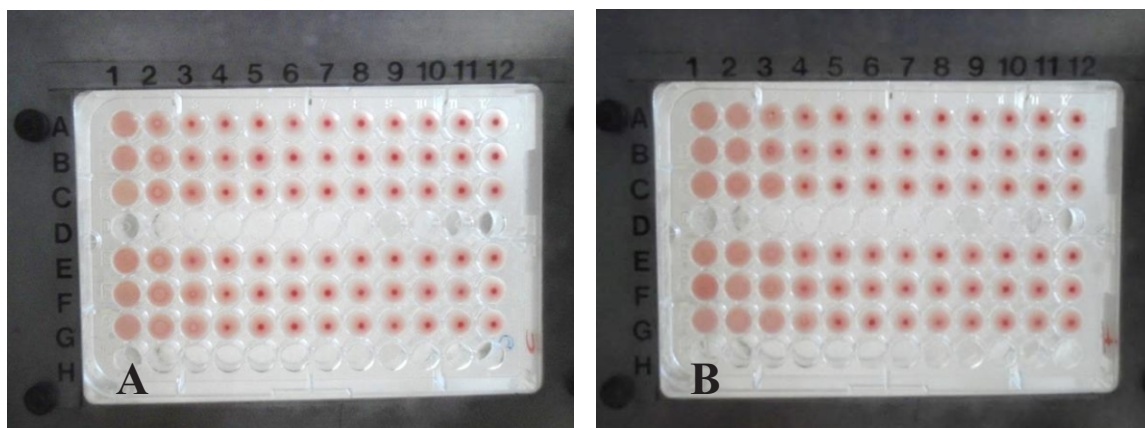
Uji kedua adalah uji HI. Pengujian menggunakan 3 serum, yaitu serum anti ND, serum anti AI, dan serum anti EDS. Uji HI yang dilakukan sebagai identifikasi dengan serum anti ND hanya menggunakan 5 sumuran. Pertama, PBS sebanyak 0,025 ml diletakkan pada sumuran 1 sampai 5. Serum anti kemudian ditambahkan sebanyak 0,025 ml pada sumuran 1, 2, dan 3. Masing-masing sumuran 1, 2, dan 3 didiluter. Cairan allantois ditambahkan ke sumuran 1 sampai 4 masing-masing 0,025 ml. Pelat mikro digoyang-goyang agar serum dan cairan allantois tercampur. Pelat mikro kemudian didiamkan selama 30 menit sebelum ditambahkan eritrosit ayam 0,05 ml pada sumuran 1 sampai 5. Hasil uji dibaca setelah eritrosit pada sumuran ke 5 mengendap (Merchant and Packer, 1961; OIE, 2012). Uji dengan serum anti AI hanya menggunakan 4 sumuran, metode yang digunakan sama dengan pengujian serum anti ND, hanya saja serum ditambahkan pada sumuran 1 dan 2, cairan allantois ditambahkan pada sumuran 1 sampai 3, dan eritrosit ditambahkan pada sumuran 1 sampai 4 (OIE, 2009). Khusus pada uji HI dengan serum anti EDS, serum diencerkan dengan PBS 1:2, cairan allantois dengan PBS 1:2, penambahan eritrosit dilakukan setelah 15 menit dengan konsentrasi 0,8% (Merchant and Packer, 1961; Purchase *et al.*, 2008; Adair dan Joan, 2008).

Hasil dan Pembahasan

Uji HA menggunakan cairan allantois dari inokulasi suspensi cucian telur sampel FF/Sleman/2011 menunjukkan titer HA 2^2 unit (Gambar 1.A). Uji HA menggunakan cairan allantois dari inokulasi uterus ayam sampel FF/Sleman/2011 (baris A, B, dan C) maupun sampel SR/WNO/2011

(Baris E, F, dan G) menunjukkan titer HA 2^3 unit (Gambar 1.B). Sampel air cucian telur dari sampel FF/Sleman/2011 digunakan karena telur yang dihasilkan oleh ayam terinfeksi mengandung virus di bagian luar maupun dalam (Jordan, 2008; Rasool

et al., 2005). Uterus dipakai karena merupakan tempat replikasi virus EDS, terutama pada *shell gland*. Replikasi inilah yang menyebabkan inflamasi dan telur yang dihasilkan ayam terinfeksi menjadi abnormal (Adair and Joan, 2008).



Gambar 1. Hasil uji HA terhadap cairan allantois dari inokulasi suspensi virus. **A.** Dua suspensi cucian telur sampel FF/Sleman/2011 menunjukkan titer 2^2 unit HA. Masing-masing suspensi diuji sebanyak 3 baris. **B.** Suspensi uterus ayam sampel FF/Sleman/2011 dan SR/WNO/2011 keduanya menunjukkan titer 2^3 unit HA.

Hasil titer yang kecil pada penelitian kemungkinan diakibatkan oleh kurangnya jumlah pasase saat propagasi, yaitu hanya satu kali. Penelitian yang dilakukan oleh Suresh *et al* (2012) menunjukkan peningkatan titer HA seiring penambahan jumlah pasase. Peningkatan titer dari jumlah pasase satu sampai lima adalah 4, 6, 9, 12, dan 15. Titer virus pada unggas dapat bervariasi jika unggas yang digunakan tidak sedang dalam fase penyakit dimana titer virus maksimal (Adair and Joan, 2008).

Isolasi virus EDS menggunakan TBB karena virus EDS dapat tumbuh dengan titer tinggi pada media tersebut (MacLachlan dan Edward, 2011). Pemakaian telur ayam berembrio (TAB) dianggap tidak sesuai karena virus EDS tidak dapat tumbuh pada media tersebut. Penggunaan TBB juga memiliki keuntungan karena TBB tidak mendukung

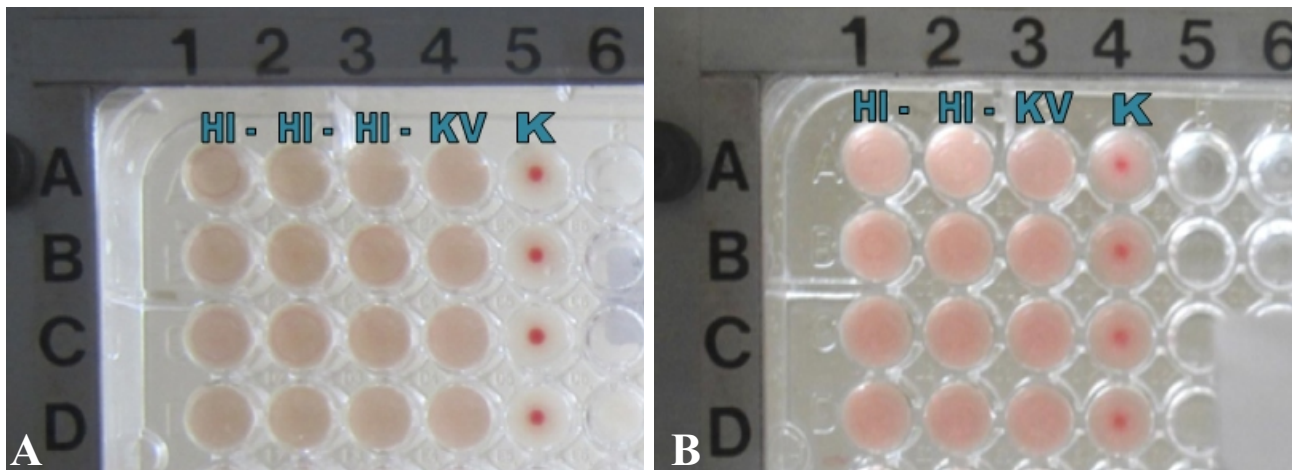
pertumbuhan virus ayam lainnya (Adair and Joan, 2008; Purchase *et al.*, 2008). Perubahan embrio pada TBB yang telah diinokulasi sampel virus terduga EDS berupa perdarahan, sedikit pertumbuhan bulu, dan kematian. Hal ini berbeda dengan perubahan embrio ayam yang diakibatkan infeksi virus tertentu seperti virus IB yang menyebabkan embrio menjadi kerdil dan bergelung (*curling*), atau virus ND yang menyebabkan kematian (Cavanagh and Jack, 2008; Alexander and Senne, 2008).

Uji HI merupakan uji spesifik untuk menguji virus EDS dan tidak bereaksi silang dengan antibodi dari infeksi Aviadenovirus (MacLachlan and Edward, 2011). Uji HI pada penelitian menggunakan metode HI cepat untuk identifikasi. Uji HI dilakukan menggunakan tiga serum anti, yaitu serum anti ND, AI, dan EDS. Pengujian dengan serum anti ND dan AI dilakukan sebagai diagnosa banding karena virus

penyebab ND (*Paramyxoviridae*) dan AI (*Orthomyxoviridae*) dapat mengaglutinasi eritrosit (Burleson *et al.*, 1992).

Uji HI menggunakan serum anti virus IB tidak dilakukan karena virus IB memerlukan perlakuan *phospholipase C* (PLC) terlebih dahulu.

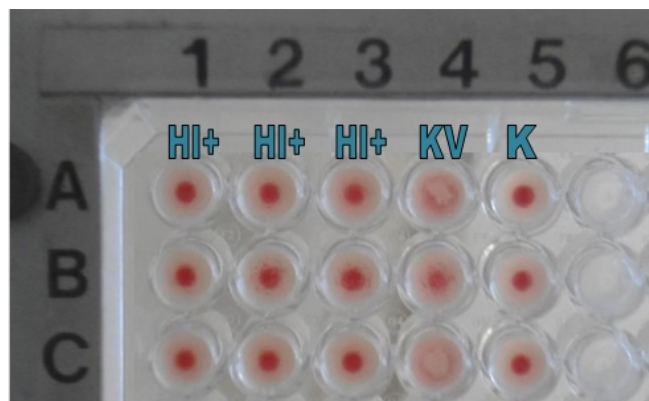
Phospholipase C merupakan suatu enzim yang dihasilkan oleh bakteri *Clostridium perfringens* yang dapat menghidrolisis *phosphatidyl choline* pada struktur amplop virus IB sehingga virus mampu mengaglutinasi eritrosit (Tso and Christian, 1988; Lashgari and Newman, 1982).



Gambar 2. Uji HI dengan serum anti ND (A) dan serum anti AI (B) keduanya menunjukkan hasil negatif terhadap cairan allantois dari suspensi air cucian telur dan suspensi uterus ayam sampel FF/Sleman/2011 maupun suspensi uterus ayam sampel SR/WNO/2011. KV merupakan sumuran kontrol virus dan K merupakan sumuran kontrol eritrosit.

Gambar 2 keduanya menunjukkan hasil uji HI negatif. Virus yang diuji tidak spesifik dengan anti ND maupun anti AI dalam serum sehingga tidak saling berikatan. Virus yang bebas kemudian

mengikat eritrosit dan membentuk aglutinat. Virus yang ada disimpulkan bukan merupakan virus ND ataupun AI.



Gambar 3. Uji HI menggunakan anti serum EDS menunjukkan hasil positif terhadap cairan allantois dari suspensi air cucian telur (A1, A2, dan A3) dan suspensi uterus ayam (B1, B2, dan B3) sampel FF/Sleman/2011, dan suspensi uterus ayam (C1, C2, dan C3) sampel SR/WNO/2011. Kolom 4 merupakan kontrol virus (KV). Kolom 5 merupakan kontrol eritrosit (K).

Gambar 3 menunjukkan adanya endapan eritrosit pada sumuran uji. Hal ini terjadi karena virus berikatan dengan anti EDS dalam serum sehingga eritrosit yang tidak terikat akan mengendap. Ikatan tersebut menunjukkan hasil yang positif karena virus ternyata spesifik dengan serum anti EDS.

Proses isolasi dan identifikasi antara virus ND, AI, dan EDS memiliki beberapa perbedaan. Isolasi pada virus ND dan AI dilakukan pada TAB, sementara isolasi virus EDS dilakukan pada TBB karena pada TAB dianggap tidak sesuai (Purchase *et al.*, 2008; Adair and Joan, 2008). Identifikasi menggunakan uji HI pada virus ND, AI, dan EDS prinsip metodenya sama. Virus yang ada dalam cairan allantois diuji apakah spesifik dengan serum anti yang tersedia. Perbedaannya terletak pada jumlah konsentrasi eritrosit yang digunakan. Uji HI pada virus ND dan AI menggunakan konsentrasi eritrosit 0,5 % (Burleson *et al.*, 1992) sedangkan pada EDS konsentrasinya 0,8% (Purchase *et al.*, 2008; Adair dan Joan, 2008). Perbedaan lainnya adalah waktu inkubasi sebelum penambahan eritrosit. Waktu inkubasi pada uji HI dengan serum anti ND dan AI pada temperatur ruang adalah 30 menit (OIE, 2009; OIE, 2012) sementara uji HI dengan serum anti EDS hanya membutuhkan waktu

15 menit (Purchase *et al.*, 2008). Virus ND maupun AI mampu mengaglutinasi eritrosit karena memiliki protein hemagglutinin yang menyusun salah satu *spike* glikoprotein di permukaan partikelnya (Cann, 2005; MacLachlan and Edward, 2011). Hal ini berbeda dengan virus EDS yang kemampuan aglutinasinya disebabkan adanya *fiber* yang berperan sebagai hemagglutinin (Zuckerman *et al.*, 2009). Uji HI virus EDS juga memiliki perbedaan dengan uji HI virus IB. Uji HI virus IB selain memerlukan perlakuan PLC, uji juga dilakukan pada suhu 4 °C. Waktu inkubasi sebelum penambahan eritrosit adalah 30 menit dan eritrosit yang digunakan konsentrasinya 1% (OIE, 2013).

Faktor-faktor yang mempengaruhi hemagglutinasi berbeda-beda pada tiap virus. Faktor-faktor tersebut antara lain eritrosit hewan yang digunakan, pH pengencer, dan temperatur inkubasi (Burleson *et al.*, 1992). Faktor lain menurut Hierholzer *et al.* (1969), adalah pengenceran, volume, dan perlakuan serum. Uji HI dengan serum anti EDS yang berhasil dilakukan ditunjukkan pada gambar 3. Uji tersebut menggunakan serum dan cairan allantois yang diencerkan dengan PBS masing-masing 1:2. Konsentrasi eritrosit yang digunakan sesuai dengan Adair dan Joan (2008), yaitu 0,8%.

Tabel 1. Hasil pengujian HA dan HI

Sampel	Jenis Sampel	Uji HA (unit HA)	Uji HI		
			Serum anti ND	Serum anti AI	Serum anti EDS
SR/WNO/2011	uterus	uterus	2 ³	-	+
FF/Sleman/2011	uterus	uterus	2 ³	-	+
		cucian telur	2 ²	-	+

Hasil pengujian HA ketiga sampel dan HI dengan serum anti ND, AI, dan EDS dibandingkan dalam Tabel 1. Pengujian menggunakan serum anti ND dan AI menunjukkan interpretasi negatif yang ditandai terbentuknya aglutinat pada dasar sumuran yang menandakan bahwa virus yang ada tidak spesifik dengan serum anti sehingga virus bebas mengaglutinasi eritrosit. Pengujian menggunakan serum anti EDS menunjukkan interpretasi positif yang ditandai dengan adanya endapan eritrosit di dasar sumuran. Hal ini menandakan virus yang ada bersifat spesifik terhadap serum anti EDS sehingga disimpulkan virus yang diidentifikasi adalah virus EDS.

Penggunaan serum anti ND dan AI dalam identifikasi diperlukan untuk mengonfirmasi kemungkinan adanya pertumbuhan virus lain yang mempunyai kemampuan hemaglutinasi. Aktivitas hemaglutinasi juga dapat disebabkan agen non virus, misalnya bakteri *Bordetella avium*. Perbedaannya adalah bakteri *Bordetella avium* hanya dapat mengaglutinasi eritrosit marmot (Quinn *et al.*, 2007). Uji HI dengan serum anti ND dan AI yang menunjukkan hasil negatif membuktikan bahwa tidak ada agen lain selain virus EDS dalam cairan allantois yang dapat mengaglutinasi eritrosit.

Daftar Pustaka

- Adair, B.M. and Joan, A.S. (2008) Egg drop syndrome. In: Saif, Y.M, A.M Fadly, J.R Glisson, L.R McDougald, L.K Nolan. and D.E Swayne. Diseases of Poultry, Twelfth edition. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Alexander, D.J. and Senne, D.A. (2008) Newcastle disease. In: Saif, Y.M, A.M Fadly, J.R Glisson, L.R McDougald, L.K Nolan, dan D.E Swayne. Diseases of Poultry, Twelfth Edition. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Brooks, G.F., Jane, S.B. and Stephen, A.M. (2005) Mikrobiologi kedokteran. Salemba Medika, Jakarta.
- Burleson, F.G., Thomas, M.C. and Danny, L.W. (1992) Virology, a laboratory manual. Academic Press, London, United Kingdom.
- Cann, Alan J. (2005) Principles of molecular virology, Fourth edition. Elsevier, Singapore.
- Cavanagh, D. and Jack Gelb Jr. (2008) Infectious bronchitis. In: Saif, Y.M, A.M Fadly, J.R Glisson, L.R McDougald, L.K Nolan, dan D.E Swayne. Diseases of Poultry, Twelfth Edition. Blackwell Publishing, Iowa. Hal. 120
- Dinev, Ivan. (2007) Diseases of poultry a colour atlas. Ceva Sante Animal, Stara Zagora.
- Hierholzer, J.C. Morris T.S. and Elmer, C.H. (1969) Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Applied Microbiol.* 18: 824.
- Isandiny, Nurillah. 2010. Profil titer antibodi respon imun humoral (IgG) pada ayam *layer* yang telah diberi vaksin tunggal EDS inaktif isolat lokal. Skripsi. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Jordan, Frank, *et al.* (2008) Poultry Diseases. Elsevier, China.
- Kencana, Gusti Ayu Y. (2012) Penyakit Virus Unggas. Udayana University Press, Denpasar.
- Kraft, V., Grund, S. and Monreal, G. (1979) Ultrastructural characterisation of isolate 127 of egg drop syndrome 1976 virus as an adenovirus. *Avian Pathol.* 8: 353-361.
- Lashgari, M.S. and Newman, J.A. (1981) Preparing hemagglutinating antigen from isolates of infectious roncchitis virus. *Avian Dis.* 26: 508.
- MacLachlan, N.J. and Edward, J.D. (2011) Fenner's veterinary virology. Elsevier, China.

- Mahy, B.W.J. and Hillar, O.K. (1996) Virology methods manual. Academic Press, London, United Kingdom.
- Merchant, I.A. and Packer, R.A (1961) Veterinary bacteriology and virology, Sixth edition. Iowa States University Press, Iowa, USA.
- Murtidjo, Bambang Agus. (1992) Pengendalian hama dan penyakit ayam. Kanisius, Yogyakarta.
- Nuriyanto, M.R. (1983) Egg drop syndrome 1976. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- OIE (2009) Avian influenza. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.3.4.
- OIE (2012) Newcastle disease. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.3.14.
- OIE (2013) Avian infectious bronchitis. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.3.2.
- Purchase, H.G., Lawrence, H.A, Charles, H.D. and James, E.P. (2008) A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Third edition. Kendall/Hunt Publishing Company. Iowa, USA.
- Quinn, P.J, Marley, B.K.E., Carter, M., Donnelly, W.J.C., Leonard, F.C. and Maghire, D. (2007) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science, Singapore.
- Rasool, M.H., Rahman, S.U. and Mansoor, M.K. (2005) Isolation of egg drop syndrome virus and its molecular characterization using sodium dodecyl sulphate polycrylamide gel electrophoresis. *Pakistan Vet.* 25: 155-158.
- Suresh P., Shoba, K. and Rajeswar, J.J. (2012) Incidence of egg drop syndrome-1976 in Namakkal District, Tamil Nadu, India. *Vet. World* 6: 51.
- Tabbu, C.R. (2000) Penyakit ayam dan penanggulangannya, penyakit bakterial, mikal, dan viral Volume 1. Kanisius, Yogyakarta.
- Tso, J.Y. and Christian, S. (1989) Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Am. Soc. Microbiol Infect. Immun.* 57: 468.
- Zuckerman, Arie, J., Jangu, E.B., Barry, D.S., Paul, D.G. and Philip, M. (2009) Principles and practice of clinical virology. Sixth edition. Wiley-Blackwell, Singapore.